

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCI.

1904

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1904

Fisiologia. — *Sull'autodigestione della pepsina* (1). Nota del dott. AMEDEO HERLITZKA, presentata dal Socio A. MOSSO.

Le numerose ricerche che da vari autori vennero eseguite per stabilire la natura chimica della pepsina hanno dimostrato che questo fermento è indubbiamente una sostanza azotata, contenente zolfo e cloro nella molecola. Secondo Nencki e Sieber (2) la pepsina sarebbe costituita da una « molecola gigante » in cui entrerebbero a far parte un nucleoproteide, albumosi, acido cloridrico e lecitina. Pekelharing però, che prima (3) aveva pure esso ottenuto un nucleoproteide che considerò come pepsina, in un lavoro successivo (4) preparò una pepsina che non conteneva fosforo. L'analisi elementare dei suoi prodotti diede in media le cifre seguenti:

C = 52 %; H = 7,07 %; N = 14,44 %; S = 1,63 %; Cl = 0,49 %.

La pepsina ottenuta col metodo di Brücke dà alcune ma non tutte le reazioni delle sostanze proteiche, così dà la reazione xantoproteica, precipita con l'acetato basico di piombo e con quello neutro, ma non precipita con la massima parte dei reagenti degli alcaloidi.

Risulta da tutto questo che rimane dubbio se la pepsina sia una sostanza molto affine alle sostanze proteiche o se non debba piuttosto esser considerata come una sostanza proteica vera e propria.

È noto d'altra parte per le ricerche di Langley (5) e per quelle di Mees (6) che la pepsina viene distrutta per opera della tripsina, cioè dei fermenti proteolitici. Perciò sembra ovvio ritenere che la pepsina stessa sia realmente una sostanza proteica.

Mi è perciò sembrato legittimo il dubbio che — se in realtà la pepsina è una sostanza proteica — essa debba digerire in parte sè stessa. Per accertarmi dell'esattezza di questa ipotesi ho intraprese le ricerche che qui brevemente comunico.

(1) Lavoro eseguito nel laboratorio di Fisiologia di Torino.

(2) M. Nencki e N. Sieber, *Beiträge zur Kenntniss des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme*. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 32, S. 291.

(3) C. A. Pekelharing, *Ueber eine neue Bereitungsweise des Pepsins*. Ibid. Id. 22. S. 233.

(4) Lo stesso, *Mittheilungen über Pepsin*. Ibid. Bd. 35. S. 8.

(5) J. M. Langley, *On the destruction of ferments in the alimentary canal*. Journal of Physiology, vol. III, pag. 246.

(6) L. Mees, *Oved entscheidingen omsetting van degesters fermenter*. Groningen, 1885 (citata in un riassunto).

Mi sono servito a questo scopo della « Pepsina pura in pagliette » di Merck. Questa dà in acqua distillata una soluzione opalescente, torbida, viscosa di reazione neutra; riduce, ma poco intensamente, l'ossido idrato di rame. Dà la *reazione del biureto violetta non evidente* la soluzione diventa più trasparente per l'aggiunta di idrato sodico e ridiventa torbida con sottile precipitato per l'aggiunta di una soluzione diluita di acido acetico. Anche la soluzione originale in acqua distillata diventa più torbida e si nota un sottile precipitato per l'aggiunta di acido acetico diluito. Con l'acido nitrico dà la reazione xantoproteica.

Non si ha coagulazione al calore in soluzione acida.

Ho voluto innanzi tutto vedere se lasciando la pepsina a sè nel termostato a 40° in presenza di una soluzione di acido cloridrico dall'1 al 5 ‰ si aveva la formazione di peptoni.

Ecco uno di questi esperimenti:

Soluzioni di pepsina in acido cloridrico al 0.5 ‰.

La soluzione originale non dà la reazione del biureto distinta; da principio non la dà affatto; dopo molto tempo si vede una colorazione giallo-violetta che aumenta col tempo.

Il giorno 29 febbraio 1904 a ore 11 si mette la pepsina nel termostato ancora freddo e si comincia il riscaldamento:

A ore 14. La temperatura del termostato è 34°.

A ore 16. Si preleva un campione; la reazione rosea del biureto leggerissima si ottiene subito.

A ore 16,37. Si preleva un altro campione che si lascia raffreddare: reazione rosea del biureto, abbastanza intensa, si ha immediatamente.

A ore 17,20. Si preleva un terzo campione: si ha immediatamente la reazione rosea del biureto evidentissima e intensa.

A ore 11,45 del giorno seguente. Reazione intensa immediata rosea; l'esperienza si interrompe.

In questo come in tutti gli altri esperimenti analoghi, partendo da un preparato che dava la reazione del biureto molto incerta, si ottiene dopo una permanenza nel termostato di qualche ora una reazione del biureto rosea evidentissima. Ciò dimostra che nella soluzione di pepsina si sono formati peptoni.

Senonchè sarebbe affrettato concludere da ciò che i peptoni provengono dall'autodigestione della pepsina, perchè con la pepsina stessa potrebbero essere commiste altre sostanze proteiche, per quanto ciò sia reso poco probabile dalle reazioni presentate dalla pepsina. In ogni modo ho voluto eliminare questo dubbio purificando la pepsina in due modi diversi:

1) La pepsina è lasciata per 48 ore nel termostato in soluzione cloridrica; si tratta la soluzione con acido fosforico e si neutralizza con acqua di calce, si filtra, il precipitato si scioglie in acido cloridrico e si dializza.

Il liquido così trattato *non dà reazione del biuretto.*

Cito qui dal giornale un'esperienza fatta con questo liquido.

10 marzo 1904, ore 19 $\frac{1}{2}$: la soluzione di pepsina ottenuta col metodo di Brücke — contenente il 2‰ di acido cloridrico — si mette nel termostato;

11 marzo, ore 10, dà la reazione del biuretto tra violetto e roseo, evidente per quanto debole.

12 marzo, ore 12, dà la reazione del biuretto roseo. Si interrompe l'esperimento.

2) La pepsina dopo 48 ore di permanenza nel termostato in soluzione cloridrica si tratta con solfato d'ammonio in sostanza fino a saturazione della soluzione; il precipitato si scioglie e si dializza.

Anche il liquido così ottenuto *non dà la reazione del biuretto*, messo nel termostato in presenza del 2‰ di acido cloridrico dà dopo 11 a 24 ore la reazione del biuretto rosea evidente per quanto debole.

Da queste due serie di esperienze risulta che, lasciando la pepsina purificata e liberata dalle ultime tracce di altre sostanze proteiche in soluzione cloridrica alla temperatura di 40°, si ha la formazione di peptone. Questo peptone può originarsi unicamente dalla pepsina che si trasforma per autodigestione. Non si può ammettere che altre sostanze proteiche non peptonizzate vengano precipitate insieme alla pepsina, perchè già prima della digestione la « pepsina in pagliette » Merck contiene certamente piccolissime quantità di altre sostanze proteiche, come è dimostrato dalle reazioni che essa dà e principalmente dalla assenza della reazione del biuretto. È evidente che nella digestione prolungata per 48 ore fatta in presenza di quantità relativamente grandi di pepsina, tutte le altre sostanze proteiche dovevano essere completamente digerite. Se d'altra parte fossero rimasti degli albumosi non completamente peptonizzati, questi si sarebbero dovuti porre in evidenza dalla prova del biuretto, tentata sulla soluzione del precipitato ottenuto col solfato d'ammonio. Mi sembra perciò che si possa concludere che la reazione del biuretto era dovuta nei miei esperimenti alla peptonizzazione della pepsina stessa. Certamente con questo metodo la quantità del peptone formato è molto piccola, ma bisogna riflettere che anche la quantità di pepsina che con queste purificazioni si ottiene è piccolissima e che — come vedremo — la pepsina offre una resistenza molto maggiore delle altre sostanze proteiche alla digestione peptica.

Uno studio quantitativo sull'autodigestione della pepsina non è però possibile con questi metodi, ed era d'altra parte conveniente esaminare le modificazioni che la attività della pepsina stessa subisce nell'autodigestione. Ho creduto perciò utile studiare il potere digestivo della pepsina nei vari periodi dell'autodigestione. A questo scopo mi sono servito del metodo di Mett che consiste nel porre piccoli cilindri di circa 2 mm. di luce, in cui si sia fatto coagulare del bianco d'uovo, nel liquido da esaminare e di lasciarveli alla temperatura di 40° per un determinato numero di ore.

Alla fine dell'esperimento si misura la lunghezza del cilindro di bianco d'uovo digerito.

Io ho proceduto come segue:

Fatta una soluzione di pepsina in acido cloridrico dall'1 al 5‰ la divido in due parti, di cui l'una rimane a temperatura ordinaria, l'altra viene posta nel termostato; oppure la soluzione viene posta prima per 48 nel termostato, e poi divisa in due parti di cui l'una rimane nel termostato, l'altra viene posta a temperatura ordinaria. In ciascuna esperienza si prendono ogni giorno, o ogni due o tre giorni, con una pipetta 25 c.³ di ciascuna delle due soluzioni corrispondenti di pepsina, si portano in due becher dove si lasciano finchè abbiano assunta la medesima temperatura. Allora si mettono in ciascuno dei due becher 3-4 cilindri di bianco d'uovo coagulato. Per ovviare per quanto è possibile alle cause d'errore si paragonano i cilindri a due a due; i due cilindri paragonati tra di loro si ottengono tagliando a metà un cilindretto, e ciò per rendere trascurabile il difetto di cilindricità dei tubi in cui è coagulato il bianco d'uovo.

Naturalmente i due cilindri che si paragonano hanno sino a frazioni di millimetro, la stessa lunghezza. I cilindri prima di essere messi nei liquidi digestivi, si misurano con un compasso munito di nonio. I becher con i cilindri si lasciano nel termostato per 24 ore, dopo di che si versa via il liquido digestivo, si lavano i cilindri e si misura con lo stesso compasso la parte rimasta non digerita.

Riporto qui come esempio un esperimento prolungato per molto tempo.

Il 7 marzo 1904 a ore 12 metto nel termostato una soluzione di pepsina in acido cloridrico al 0,4‰, che già era rimasta nel termostato per 48 ore; un'altra porzione della stessa soluzione di pepsina — anche questa digerita già per 48 ore — rimane alla temperatura dell'ambiente (circa 16°) e serve da controllo.

L'8 marzo 1904 a ore 18,27 prendo 25 c.³ di ciascuna delle due soluzioni e vi metto quattro cilindri per ciascuna a digerire.

Il 9 marzo 1904 a ore 17,45 si interrompe la digestione.

Nella tabella seguente sono notate le lunghezze rispettive dei cilindri di bianco d'uovo coagulato e quelle della parte digerita. In ciascuna linea orizzontale si trovano i dati che si riferiscono ai due cilindri confrontati tra di loro.

Nella colonna verticale *a* si trova la lunghezza dei cilindri posti a digerire nella pepsina di controllo, in quella *b* la lunghezza del cilindro restato alla fine della digestione, in quella *c* la differenza dei due dati precedenti, cioè la lunghezza del cilindro digerito. Nelle colonne *d*, *e*, *f* si hanno i dati corrispondenti per i cilindri messi a digerire nella pepsina restata nel termostato. Nell'ultima colonna *g* abbiamo infine la differenza tra

la lunghezza del cilindro digerito dalla pepsina di controllo e quello del cilindro digerito dalla pepsina restata nel termostato.

Le misure sono date in millimetri.

<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
15,9	9,4	6,5	15,65	9,6	6,05	0,45
22,8	16,1	6,7	22,5	16,75	5,75	0,95
19,1	12,2	6,9	19,0	13,2	5,8	1,1
22,25	15,9	6,35	21,9	16,4	5,5	0,85

Da questa prima tabella risulta che la pepsina restata nel termostato digerisce alquanto meno di quella di controllo. Ma per avere un reale criterio della diminuzione del potere digestivo della pepsina in esame non bisogna guardare alla differenza in millimetri tra il bianco d'uovo digerito dalla pepsina tenuta nel termostato e quello digerito dalla pepsina di confronto, ma bisognerà fare il rapporto tra la differenza stessa e la lunghezza del bianco d'uovo digerito dalla pepsina di controllo. E poichè il minore potere digestivo dipende da una diminuzione della pepsina dovuta alla sua autodigestione, il rapporto tra questi due numeri (quelli delle colonne *c* e *g*) ci indicherà il rapporto tra quantità di pepsina digerita e quella originale; noi possiamo fare quest'ultima uguale a 100 e abbiamo così per le quattro linee orizzontali della tabella precedente i seguenti quozienti che chiamerò *quozienti di autodigestione*.

$$\frac{6,923}{100} \quad , \quad \frac{14,179}{100} \quad , \quad \frac{15,942}{100} \quad , \quad \frac{13,385}{100}$$

e in media

$$\frac{12,607}{100}$$

Come si vede i quozienti — fatta eccezione del primo — si corrispondono abbastanza bene; essi significano che in media circa il 12,6% della pepsina originale ha subito il processo di digestione.

Continuando a tenersi la pepsina nel termostato e ripetendo lo stesso esperimento dopo 101, 125 e 175 ore di permanenza nel termostato si hanno i dati riportati nelle seguenti tabelle; la disposizione dei dati in esse è come per la tabella precedente, solo nella colonna *h* sono aggiunti i quozienti di autodigestione.

Dopo 101 ore.
L'esperimento comincia a ore 17 del giorno 11 marzo, cessa a ore 14,30 del giorno seguente.

a	b	c	d	e	f	g	h
28,6	24,2	6,4	29,1	25,1	4,1	2,2	$\frac{34,39}{100}$
24,3	18,1	6,2	23,7	19,5	4,2	2,0	$\frac{32,258}{100}$
17,7	11,9	5,8	17,4	13,2	4,2	1,6	$\frac{27,586}{100}$
17,6	12,3	5,3	18,2	14,5	3,7	1,6	$\frac{30,188}{100}$

Media quoziente autodigestione $\frac{31,1}{100}$

Dopo 125 ore.

Principia 12 marzo ore 17,30, finisce 13 marzo ore 17.

a	b	c	d	e	f	g	h
23,5	16	7,5	22,9	18,7	4,2	3,3	$\frac{44}{100}$
15,5	9,1	6,4	15,9	11,8	4,1	2,3	$\frac{35,937}{100}$
23,7	17,2	6,5	23	18,7	4,3	2,2	$\frac{33,846}{100}$
19,4	12,6	6,8	19,4	15,4	4,0	2,8	$\frac{41,176}{100}$

Media quoziente autodigestione $\frac{38,739}{100}$

Dopo 175 ore.

Principia a ore 19,25 del 14 marzo e finisce a ore 17 del 15 marzo.

a	b	c	d	e	f	g	h
23,4	18,3	5,1	24,0	21,4	2,6	3,5	$\frac{68,631}{100}$
21,4	15,8	5,6	21,8	19,1	2,7	2,9	$\frac{51,785}{100}$
17,5	12,4	5,1	17,1	14,6	2,4	2,7	$\frac{52,941}{100}$
12,2	6,8	5,4	12,3	9,3	3,0	2,4	$\frac{44,44}{100}$

Media quoziente autodigestione $\frac{54,45}{100}$

Se noi esaminiamo i dati di queste tabelle vediamo che col crescere della durata dell'esperimento il quoziente di autodigestione diventa sempre più grande, cioè una quantità sempre maggiore di pepsina viene digerita. Se la quantità di pepsina digerita sia proporzionale alla durata dell'esperimento non posso però dire, non avendo un numero sufficiente di esperimenti prolungati per molto tempo.

Se noi confrontiamo i dati della colonna *c* dell'ultima tabella con quelli delle colonne corrispondenti delle tabelle precedenti vedremo che la pepsina di controllo ha digerito in quest'ultimo esperimento una minor quantità di bianco d'uovo che negli esperimenti precedenti; il che dimostra che anche alla temperatura dell'ambiente (circa 16°) avviene il processo d'autodigestione sebbene molto più lentamente che alla temperatura del corpo umano; e questo corrisponde a quanto si sa della comune digestione peptica. Avendo appunto notata questa autodigestione della pepsina di controllo ho interrotta questa serie di esperimenti.

In questa serie di esperimenti — che ho riportata per la lunga durata — mi sono servito come controllo di pepsina che già era stata per 48 ore a 40°. Ma in altre esperienze ho invece adoperate soluzioni di pepsina non rimaste nel termostato. I risultati di questi esperimenti sono perfettamente analoghi a quelli riportati.

Da queste ricerche risulta che la pepsina lasciata a sè nel termostato in presenza di acido cloridrico perde lentamente della sua attività e che in questo processo si ha la formazione di peptoni. Mi pare perfettamente giustificato considerare questo processo come dipendente dall'attività della pepsina stessa di cui una parte agisce su un'altra peptonizzandola, cioè come una vera autodigestione della pepsina. Questi risultati sperimentali portano un nuovo contributo alla conclusione che la pepsina sia una vera e propria sostanza proteica.

Quale azione esercitino la temperatura, l'acidità e la quantità stessa della pepsina sul quoziente d'autodigestione, cioè sul rapporto tra la pepsina totale e quella digerita, e come questa cresca col tempo sono argomenti che abbisognano di ulteriori ricerche.

CORRISPONDENZA

Ringraziano per le pubblicazioni ricevute:

L'Accademia delle scienze di Lisbona; l'Accademia delle scienze di Nuova York; la Società di scienze naturali di Bonn; la Società zoologica di Tokyo; la Società geologica di Sydney; i Musei di storia naturale di Amburgo e di Nuova York; gli Osservatori di Arcetri e di San Fernando.

V. C.
